

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0225-04

原癌基因 HER2 转录调控的研究进展

钱露 综述; 郭宁 审阅 (军事医学科学院基础医学研究所分子免疫室, 北京 100850)

[摘要] 原癌基因 HER2 在许多肿瘤中过表达, 与肿瘤发生、发展密切相关。抑制 HER2 过表达已成为肿瘤治疗的新靶点。肿瘤细胞 HER2 过表达主要由其基因转录水平的异常增高引起, 通过抑制 HER2 基因启动子活性实现肿瘤细胞 HER2 的低表达能够有效抑制肿瘤细胞的生长。因此深入阐明 HER2 转录调控机制, 可能为靶向 HER2 的肿瘤治疗策略提供新思路。

[关键词] HER2; 启动子; 转录调控; 肿瘤治疗

[中图分类号] R73-37 [文献标志码] A

原癌基因 HER2 编码 185 kD 的受体酪氨酸激酶 P185, 该蛋白在胚胎发育中广泛表达, 在成年正常组织中的表达量很低, 而在乳腺癌、卵巢癌等多种上皮性肿瘤组织中可异常高表达, 表达水平高达正常组织的几十甚至几百倍^[1]。HER2 过表达可导致细胞的恶性转化, 并与肿瘤预后密切相关。肿瘤细胞 HER2 过表达主要由于该基因转录增强和(或)基因扩增所致。早期研究曾强调基因扩增致 HER2 过表达, 但随后的研究发现不发生基因扩增的肿瘤细胞也会出现 HER2 的异常表达, 并观察到 HER2 高表达细胞的转录效率常常高出正常细胞几十倍, 提示转录调控的激活对 HER2 过表达起了更为重要的作用。HER2 基因的转录主要受 HER2 启动子的顺式作用元件和反式作用因子的协同调控。经过十多年的研究, 多个介导肿瘤 HER2 启动子激活的顺式作用元件和转录因子已经得到鉴定, 这为靶向 HER2 的肿瘤治疗策略提供了新思路。

1 HER2 启动子的特征

1.1 结构特征

Tal 等^[2]在 1987 年用核酶保护实验首次确定了 HER2 启动子的位置, 发现 HER2 具有 2 个转录起始位点, 一个依赖于 TATA 盒的主要起始位点 +1 和一个不依赖于 TATA 盒的次要起始位点 -69, 提示 HER2 具有 2 套转录起始机制。HER2 属 EGFR 家族成员, 与 EGFR 的结构和功能高度相似, 但两者的启动子却具有明显不同的特征。EGFR 基因启动子不含典型的 TATA 盒和 CAAT 盒, 但含有 GC 盒, 而 HER2 启动子却相反, 无 GC 盒, 但有典型的 TATA 盒和 CAAT 盒, 分别位于 -22 bp 和 -71 bp 处。HER2 与大鼠 neu 基因启动子具有 78% 的序列同源性, 但 neu 基因启动子不存在保守的 TATA 盒。HER2 启动子的另一特征是在 TATA 盒和 CAAT 盒之间含有 27 bp GGA/TCC 镜相重复序列, 这与推测的基质附着区(MAR)位置重叠。结构分析发现这段序列可内部形成三螺旋结构的 DNA 形式, 称为 Hr-DNA^[3]。GGA/TCC 重复序列也存在于 neu 启动子区, 在 EGFR 启动子内该序列以反向互补的形式存在。此外, HER2 启动子在 CAAT 盒的上游

临近区还含有 2 对相似的迴文序列。

1.2 功能特征

启动子缺失报告载体综合分析是研究启动子功能的最常用手段, 通过对 HER2 基因 5'非翻译区(5'UTR)500 bp/6 000bp 的序列进行缺失功能分析, 并比较 HER2 高表达肿瘤细胞系和低表达细胞系中的 HER2 启动子活性, 已经初步确定: 临近核心启动子的 -300 bp 保留了 HER2 基因的大部分转录活性, 而 -300 bp 以外的 5'UTR 只能介导微弱的激活作用或可能起抑制作用; HER2 启动子活性和肿瘤细胞 HER2 的表达量具有一定的正相关。Scott 等^[4]用 DNase 1 超敏感实验亦证实, 在 HER2 基因 5'UTR 的 -6 000 bp 区域存在一个主要的超敏感位点(转录激活区), 位于核心启动子的 TATA 盒附近; HER2 高表达肿瘤细胞系(MDA-453, BT474, ZR-75-1)比 HER2 低表达肿瘤细胞系(MCF-7, BT-20, HBL100)显示出更强的超敏感位点信号, 提示肿瘤细胞存在调控 HER2 启动子活性的机制。

2 参与 HER2 转录调控的转录因子

在某些肿瘤细胞中存在着能序列特异性地与 HER2 启动子结合的 DNA 结合蛋白, 它们维持 HER2 的高水平转录, 促进细胞增殖及细胞的恶性转化, 与人类肿瘤的发生密切相关。

2.1 AP-2

AP-2 是发育性的转录调控因子, 主要含有 AP-2 α , AP-2 β 和 AP-2 γ 3 个家族成员, 它们常以二聚体形式结合到 GC 丰富的 DNA 元件上。现已发现 AP-2 与肿瘤特别是乳腺癌 HER2 高表达密切相关。Hollywood 等^[5]通过 DNase I 足迹实验观察到 HER2 启动子 -213 ~ -221 的 GCTGCCAGGC 序列可以被 HER2 高表达乳腺癌细胞系的核抽提物保护, 而不能被 HER2 低表达乳腺癌细胞系的核抽提物保护, 并从核抽提物中分离到与这段序列特异性结合的物质, 称之为 OB-2, 随后的研究证实 OB-2 即为 AP-2^[6]。AP-2 主要以同二聚体或异二聚体的形式结合在 HER2 启动子上发挥功能, 但体外实验显示 AP-2 α , AP-2 β 和 AP-2 γ 可以单独激活 HER2 启动

子, AP-2 α 和 AP-2 γ 的活性比 AP-2 γ 高 3 ~ 4 倍。AP-2 α 和 AP-2 β 在大多数 HER2 高表达的乳腺癌细胞系中的表达量也较高,提示 AP-2 α 和 AP-2 γ 在肿瘤细胞 HER2 转录调控中的作用。除了在 HER2 核心启动子区具有 AP-2 结合位点, Winkler 等^[7]在 HER2 非编码区-506 ~ -489 处还发现了一个新的 AP-2 结合位点 GCCCCGGGG,对 AP-2 有更高的亲和力,AP-2 能够同时结合 2 个位点而发挥协同作用。Winkler 等^[7]推测,当细胞内 AP-2 处于低水平时,AP-2 主要与高亲和力的-506 ~ -489 位点结合,而-213 ~ -221 位点未被占据,此时 HER2 启动子活性也较低。当 AP-2 过表达时,AP-2 将同时占据低亲和力位点,因而大大增强了 HER2 启动子的活性。

2.2 Ets 家族

Ets 家族有 30 多个成员, DNA 结合域高度保守,识别 GGAA/T 一致序列,并和侧翼序列共同决定结合的特异性。紧邻 HER2 启动子 GGA 重复序列的下游区域含有一个 Ets 结合位点(ets binding site, EBS)。EBS 是一个活性调控元件,其突变可使 HER2 启动子活性下降 60%^[4]。研究表明,EBS 和 GGA 重复序列具有协同调控作用, Ets 结合其识别序列可使 HER2 启动子区 DNA 链发生弯曲,因而限制 Hr-DNA 结构的形成,而 Hr-DNA 结构的形成亦可影响 Ets 接近 EBS^[3]。至今,尚无直接证据揭示参与调控内源性 HER2 启动子活性的 Ets, PEA3, ESX, ER81, E1f1, GABP(都曾被认为是候选因子。PEA3 和 ESX 常在 HER2 过表达的乳腺肿瘤组织中高表达。研究发现,HER2 与 PEA3 和 ESX 之间存在反馈调节, HER2 通过 Ras-MAPK 途径激活 PEA3 和 ESX 的表达,而 PEA3 和 ESX 可直接调控 HER2 启动子活性。然而,关于它们对 HER2 启动子的调控机制尚存在争议。在 COS-7 细胞, PEA3 和 ESX 可以激活 HER2 启动子活性,但在 HER2 高表达的 SKBR-3 细胞中 PEA3 和 ESX 却产生抑制作用,推测在 HER2 高表达的肿瘤细胞中, PEA3 和 ESX 可能通过与激活功能更强的 Ets 竞争结合 EBS 而发挥作用。ER81 和 E1f1 可以在多种乳腺癌细胞系(包括 SKBR-3 细胞)中激活 HER2 启动子的活性,但是肿瘤细胞中 ER81 及 E1f1 与 HER2 表达水平并不相关,它们在体内是否介导 HER2 高表达还难下结论。GABP α 表达与 HER2 表达相关,但体外实验显示 GABP α 与 EBS 仅以低亲和力结合, GABP α 与 HER2 转录调控的关系尚有待进一步研究^[4]。

2.3 核基质蛋白(NMP)

NMPs 是核基质中的蛋白成分,提供 DNA 成环的结构框架,介导基因启动子基质附着区(MAR)与核基质的联系,因此 NMPs 在基因转录调控中起重要作用。Raziuddin 等^[8]发现了一种乳腺肿瘤特异性的 NMP,其与 HER2 共表达于乳腺肿瘤组织或乳腺癌细胞系,而不表达于正常乳腺组织。研究显示,该蛋白能特异性地与 HER2 基因启动子 MAR 结合。一般说来, MAR 集中在 AT 丰富区,但是 HER2 启动子的 MAR 位于 GGA 丰富区(即 GGA 重复序列)。Raziuddin 等通过 MAR 序列特异性亲和层析从乳腺肿瘤中分离纯化了该蛋

白。把纯化的 NMP 加入乳腺癌细胞系核抽提物和 NF- κ B 探针的共孵育体系中,发现 NMP 可以增加 NF- κ B 的 DNA 结合能力。Dejardin 等^[9]亦曾报道,HER2 高表达的肿瘤细胞 NF- κ B 的 DNA 结合活性高于正常细胞。由于在 HER2 启动子 MAR 两侧有 2 个富含 NF- κ B 结合位点的区域,因此 Raziuddin 等推测, NMP 通过介导 MAR 附着于细胞核基质,使局部转录因子(如, NF- κ B)的浓度增加,从而增强了转录因子的 DNA 结合活性。对乳腺肿瘤组织和正常乳腺组织核基质的免疫印迹分析发现, NF- κ B 只存在于乳腺肿瘤组织的核基质中。除 NF- κ B, NMP 是否还协同其它转录因子参与 HER2 或其他基因的转录调控尚待研究。

2.4 免疫球蛋白 J κ 重组信号结合蛋白(RBPJ κ)

Chen 等在研究与 HER2 启动子区的两个回文序列结合的蛋白(palindrome binding protein, PBP)中发现, PBP 是一个异二聚体,由 69 kD 的 α 亚单位和 60 kD 的 β 亚单位组成, α 亚单位具有 DNA 结合活性,能与两个回文序列的部分区域结合,识别的核心序列是 TGGGAG,而 β 亚单位能够增加 α 亚单位的结合活性^[10]。进一步鉴定结果发现 PBP 即 RBPJ κ , $\alpha\beta$ 亚单位可能是 RBPJ κ 的不同剪切形式。实验表明, RBPJ κ 与 HER2 启动子的两个回文序列结合,能增加 HER2 启动子的活性。Jarriault 等对果蝇研究发现, NOTCH 胞内片段(NOTCH-IC)入核后可增加 Su(H) 的 DNA 结合活性, Su(H) 是 RBPJ κ 的同源蛋白^[11]。Chen 等^[10]基于 Jarriault 等的研究结果大胆推测 RBPJ κ 与 NOTCH-IC 可能协同调控 HER2 基因转录。细胞共转染实验结果显示, NOTCH-IC 可增加 RBPJ κ 介导的转录。RBPJ κ -NOTCH-IC 是胚胎发育中的一条重要基因调控通路, HER2 在胚胎组织中广泛表达,由此提示 RBPJ κ 协同 NOTCH-IC 可能在胚胎发育中参与 HER2 基因表达的调控。然而,肿瘤细胞 HER2 过表达是否与 RBPJ κ -NOTCH-IC 通路激活有关目前尚未有报道。

除上述转录因子外, c-Myb, p300/CBP 和 ZONAB 等也参与了 HER2 的转录调控^[12-14]。通过顺式作用元件募集转录因子调控基因启动子活性是基因转录调控的基本方式,因而,进一步探索新的转录因子对于理解肿瘤 HER2 过表达机制及发现新的药物分子靶点具有重要意义。

3 靶向 HER2 启动子治疗肿瘤的策略

由于 HER2 在肿瘤发生中的重要作用,各种阻断 HER2 作用的抗肿瘤治疗策略也应运而生。抗 HER2 蛋白抗体 Herceptin 已上市,用于 HER2 过表达肿瘤的临床治疗。各种以 HER2 为靶点的肽疫苗、酪氨酸激酶抑制剂和反义核酸的研发也取得了很大进展。但是,这些药物尚未达到令人满意的效果。而理论上讲,抑制 2 ~ 10 拷贝的 HER2 基因启动子活性比阻断肿瘤细胞表面 10⁶ 个 HER2 分子的作用更为有效^[1]。因此,尽管肿瘤细胞 HER2 过表达的机制尚未阐明,多种靶向 HER2 启动子活性的治疗策略已经萌生,大致可以分为如下 3 类:

3.1 抑制 HER2 启动子活性的转录调节因子

现已发现,某些病毒相关蛋白能够抑制 HER2 启动子的活性,如多瘤病毒增强子激活因子 3(PEA3)、5 型腺病毒早期区 1A(E1A)及 SV40 大 T 抗原。体外实验显示,它们都能降低 HER2 表达,抑制 HER2 高表达肿瘤细胞系的生长。尽管它们都能抑制 HER2 转录,但它们调控 HER2 启动子的机制不同。研究表明,PEA3 竞争结合 EBS 位点而抑制 HER2 启动子活性,而 E1A 和 SV40 大 T 抗原在 HER2 启动子上无直接识别位点,需要 p300/CBP 介导^[14]。E1A 和 SV40 大 T 抗原 N 端具有较高的同源性,可以和 p300 相互作用,从而抑制 p300/CBP 对 HER2 的转录激活作用。动物实验证实,脂质体介导的 PEA3 和 E1A 基因治疗能有效降低荷瘤小鼠的死亡率,E1A 的基因治疗已经进入了临床 II 期试验^[15]。然而,天然存在的转录调节因子虽然能抑制 HER2 转录,但它们的基因靶向性不强,可能影响其它含有相同识别位点的基因转录。

Beerli 等^[16]设计的人工转录因子可特异性地调控 HER2 转录。在 HER2 基因-24 ~ -7(相对于 ATG)处有 6 个连续的 5'-GNN-3'序列,Blast 序列分析显示这一序列是 HER2 特异性的。5'-GNN-3'是锌指结构域的识别单位,利用这一特点,他们用模块搭建(modular building)方式设计合成了多趾锌指蛋白(polyactyl zinc finger protein)基因,然后将该基因与抑制性效应结构域蛋白基因(如 KRAB,ERD 或 SID)融合表达,从而设计了一类能特异性抑制 HER2 转录的人工转录因子。体外实验显示,这类转录因子能大大降低 SKBR3 和 T47D 细胞系的 HER2 表达,并使细胞出现 G1 期阻滞。

3.2 干涉转录因子与 HER2 启动子靶序列的结合

AP-2 和 Ets 与肿瘤细胞高表达 HER2 密切相关,阻止 AP-2 和 Ets 与 DNA 识别序列的结合可能降低细胞 HER2 的表达。Hollywood 等^[17]发现抗肿瘤药物金硫丁钠具有抑制 AP-2 DNA 结合活性的作用,用金硫丁钠处理后可使 MDA-453 细胞系 HER2 表达水平明显下降。金硫丁钠能整合锌离子,并可与富含半胱氨酸的蛋白结合。AP-2 含锌指结构域,这可能是金硫丁钠影响 AP-2 DNA 结合活性的原因。虽然金硫丁钠作用是非特异性的,但却为靶向 HER2 启动子治疗肿瘤药物的开发提供了新思路。Chiang 等^[18]设计了靶向 EBS 侧翼序列 7 bp 的吡咯-咪唑多聚胺,它能与 DNA 螺旋的小沟以高亲和力结合,可抑制 Ets 与 EBS 结合,从而降低 HER2 的启动子活性。Basye 等^[19]设计了靶向 GGA 重复序列的三重寡核苷酸(triplex-forming oligonucleotides, TFO),TFO 可以和 GGA 重复序列形成 Hr-DNA 结构,阻碍 Ets 结合于 EBS 位点。

3.3 HER2 启动子驱动肿瘤杀伤基因表达

HER2 启动子在肿瘤细胞中活性增高,因此将 HER2 启动子与肿瘤杀伤基因的编码区重组形成嵌合基因,可能实现杀伤基因在 HER2 高表达肿瘤细胞中的特异性高表达,表达的杀伤基因产物将非毒性的药物转化成细胞毒性药物,从而实现 HER2 高表达肿瘤细胞的特异性杀伤^[20]。这一策略称之为基因前药物激活治疗(Genetic prodrug activation thera-

py, GPAT)。Pandha 等将大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因(CD)置于 HER2 启动子驱动之下,构建了用于 HER2 高表达乳腺癌治疗的基因载体。CD 可以将非细胞毒性的 5-氟胞嘧啶(5-FC)转化为 5-氟尿嘧啶(5-FU),5-FU 是细胞 S 期 RNA 和 DNA 合成的强力抑制剂。将 CD 载体注射入患者原发性乳腺癌结节,同时给患者服用 5-FC,可见 CD 在 HER2 高表达的乳腺癌细胞中特异性表达,导致肿瘤结节消退。I 期临床试验显示这一 GPAT 策略是安全有效的。

4 结 语

原癌基因 HER2 在人类多种肿瘤的发生过程中起着重要的作用,并一直作为肿瘤治疗靶分子倍受关注。随着肿瘤细胞 HER2 过表达转录激活机制的逐步阐明,基于 HER2 启动子设计的靶向药物亦显示其潜在的应用前景。然而,HER2 转录调控的研究仍有待进一步深入:1. HER2 基因核心启动子区以外的调控序列目前还鲜有研究,新的 DNA 顺式作用元件和转录因子的鉴定将为 HER2 高表达肿瘤治疗药物的开发提供新的靶点;2. 基因转录调控多数是联合调控的机制,转录因子间的协同作用也是今后 HER2 转录调控的研究重点,阐明转录因子间联合调控的机制将为多靶点药物设计提供有益的启示。

[参 考 文 献]

- [1] Yu D, Hung MC. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies[J]. *Oncogene*, 2000, 19(53): 6115-6122.
- [2] Tal M, King CR, Kraus MH, et al. Human HER2 (neu) promoter: Evidence for multiple mechanisms for transcriptional initiation [J]. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(7): 2597-2601.
- [3] Scott GK, Chang CH, Emy KM, et al. Ets regulation of the erbB2 promoter[J]. *Oncogene*, 2000, 19(55): 6490-6502.
- [4] Scott GK, Daniel JC, Xiong X, et al. Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(31): 19848-19858.
- [5] Hollywood DP, Hurst HC. A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene c-erbB-2 in mammary tumour lines[J]. *EMBO J*, 1993, 12(6): 2369-2375.
- [6] Boshier JM, Williams T, Hurst HC. The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(3): 744-747.
- [7] Grootclaes M, Vernimmen D, Plaza S, et al. A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(11): 2527-2531.
- [8] Raziuddin A, Court D, Sarkar FH, et al. A c-erbB-2 promoter-specific nuclear matrix protein from human breast tumor tissues mediates NF-kappaB DNA binding activity [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(25): 15715-15720.
- [9] Dejardin E, Bonizzi G, Bellahcene A. Highly-expressed p100/p52 (NFKB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cy-

- toplasm of human breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 1995, 11(9): 183-189.
- [10] Chen Y, Fischer WH, Gill GN. Regulation of the ERBB-2 promoter by RBPJkappa and NOTCH [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(22): 14110-14114.
- [11] Jarriault S, Brou C, Logeat F, *et al.* Signalling downstream of activated mammalian Notch [J]. *Nature*, 1995, 377(6547): 355-358.
- [12] Mizuguchi G, Kanei-Ishii C, Takahashi T, *et al.* c-Myb repression of c-erbB-2 transcription by direct binding to the c-erbB-2 promoter [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(16): 9384-9389.
- [13] Balda MS, Matter K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression [J]. *EMBO J*, 2000, 19(9): 2024-2033.
- [14] Chen H, Hung MC. Involvement of co-activator p300 in the transcriptional regulation of the HER-2/neu gene [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(10): 6101-6104.
- [15] Chang JY, Xia W, Shao R, *et al.* The tumor suppression activity of E1A in HER-2/neu-overexpressing breast cancer [J]. *Oncogene*, 1997, 14(5): 561-568.
- [16] Beerli RR, Segal DJ, Dreier B, *et al.* Toward controlling gene expression at will: Specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(25): 14628-14633.
- [17] Hollywood DP, Hurst HC. Targeting gene transcription: A new strategy to down-regulate c-erbB-2 expression in mammary carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1995, 71(4): 753-757.
- [18] Chiang SY, Burli RW, Benz CC, *et al.* Targeting the ets binding site of the HER2/neu promoter with pyrrole-imidazole polyamides [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(32): 24246-24254.
- [19] Basye J, Trent JO, Gao D, *et al.* Triplex formation by morpholino oligodeoxyribonucleotides in the HER-2/neu promoter requires the pyrimidine motif [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(23): 4873-4880.
- [20] Pandha HS, Martin LA, Rigg A, *et al.* Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(7): 2180-2189.

[收稿日期] 2005 - 05 - 08

[修回日期] 2005 - 06 - 10

[本文编辑] 王莹